

Received: 2007.04.20  
Accepted: 2007.10.09  
Published: 2007.11.06

## Regulacja ekspresji genu cytosolowego enzymu jabłczanowego w narządach lipogennych\*

### Regulation of extramitochondrial malic enzyme gene expression in lipogenic tissues

Ewa Stelmańska

Katedra i Zakład Biochemii, Akademia Medyczna w Gdańsku

#### Streszczenie

Cytosolowy enzym jabłczanowy (c-NADP-ME) występuje w wielu narządach ssaków, w tym również człowieka. W wątrobie i tkance tłuszczowej dostarcza on równoważników redukcyjnych (NADPH) niezbędnych w procesie syntezy kwasów tłuszczowych *de novo*. Stąd c-NADP-ME zaliczany jest do enzymów lipogennych. Aktywność enzymu jabłczanowego regulowana jest na poziomie transkrypcji i stabilizacji mRNA. Na ekspresję genu kodującego c-NADP-ME mają wpływ hormony (np.: insulina, glukagon, trijodotyronina) oraz ilość i rodzaj spożywanego pokarmu. Czynniki te modulują ekspresję genu c-NADP-ME działając poprzez wiele różnych czynników transkrypcyjnych rozpoznających swoiste sekwencje obecne w rejonie promotorowym tego genu.

W pracy przedstawiono najważniejsze informacje dotyczące budowy i regulacji ekspresji genu kodującego cytosolowy enzym jabłczanowy w tkance tłuszczowej oraz wątrobie ssaków.

**Słowa kluczowe:**

**enzym jabłczanowy • regulacja ekspresji genu • czynnik transkrypcyjny • lipogeneza**

#### Summary

Extramitochondrial malic enzyme is widely distributed in mammalian tissues, including humans. The major role of this protein in the liver and white adipose tissue is the production of NADPH required for fatty-acid synthesis. Malic enzyme thus belongs to the family of lipogenic enzymes. Malic enzyme activity is regulated both by gene transcription and mRNA stability. Malic enzyme gene expression is tightly controlled by hormonal (i.e. insulin, glucagon, triiodothyronine) and nutritional conditions. There are many transcription factors which recognize special response elements present in the malic enzyme gene promoter. In this paper some important information about the structure and regulation of malic enzyme gene expression in mammalian lipogenic tissues is presented.

**Key words:**

**malic enzyme • regulation of gene expression • transcription factor • lipogenesis**

\* Praca finansowana przez Akademię Medyczną w Gdańsku w ramach działalności statutowej ST-41 oraz pracy własnej W-141.

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_61/11474.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/11474.pdf)**Word count:** 2372**Tables:** –**Figures:** 3**References:** 77**Adres autorki:** dr n. med. Ewa Stelmańska, Katedra i Zakład Biochemii AMG, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk;  
e-mail: bori@amg.gda.pl**Wykaz skrótów:** **ACC** – karboksylaza acetylo-koenzymu A; **ACL** – liaza ATP cytrynianowa; **AP-1** – czynnik aktywujący 1 (activator protein 1); **bHLH-LZ** – zasadowa domena białkowa o budowie helisa-pętla-helisa-suwak leucynowy; **cAMP** – cykliczny 3', 5'-adenozynomonofosforan; **ChoRF** – czynnik odpowiedzi na węglowodany (carbohydrate response factor); **ChREBP** – białko wiążące sekwencję odpowiedzi na węglowodany (carbohydrate response element binding protein); **Egr-1** – białko odpowiedzi wczesnego wzrostu (early growth response protein); **FAS** – syntaza kwasów tłuszczowych; **G6PDH** – dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa; **Glc** – glukoza; **GK** – glukokinaza; **GLUT 2** – transporter glukozy 2; **GLUT 4** – transporter glukozy 4; **HK** – heksokinaza; **IRE** – sekwencje odpowiedzi na insulinę (insulin responsive elements); **ME** – enzym jabłczanowy; **c-NADP-ME** – cytosolowy NADP-zależny enzym jabłczanowy; **m-NADP-ME** – mitochondrialny NADP-zależny enzym jabłczanowy; **m-NAD-ME** – mitochondrialny NAD(P)-zależny enzym jabłczanowy; **NAD<sup>+</sup>** – dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (postać utleniona); **NADH** – dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (postać zredukowana); **NADP<sup>+</sup>** – fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (postać utleniona); **NADPH** – fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (postać zredukowana); **PBX1** – czynnik transkrypcyjny białaczki komórek pre-B (pre-B-cell leukemia transcription factor); **6PGDH** – dehydrogenaza 6-fosfoglukonianowa; **PPAR** – receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomalne (peroxisome proliferator-activated receptor); **SCAP** – białko aktywujące hydrolizę SREBP (SREBP-cleavage activating protein); **Sp1** – czynnik transkrypcyjny 1 (stimulatory protein 1); **SRE** – sekwencja odpowiedzi na sterole (sterol response element); **SREBP** – białko wiążące sekwencję odpowiedzi na sterole (sterol response element binding protein); **S1P** – proteaza jako pierwsza przecinająca SREBP (site-1 protease); **S2P** – proteaza jako druga przecinająca SREBP (site-2 protease); **T3** – trijodotyronina; **TAG** – triacyloglicerol; **TRE** – sekwencja odpowiedzi na hormony tarczycy.

## WSTĘP

Enzym jabłczanowy (ME) z wątroby gołębia opisali pod koniec 1946 r. trzej współpracujący ze sobą uczeni: Severo Ochoa, Alan Mehler i Arthur Kornberg [36]. Obecnie wiadomo, że jest on szeroko rozpowszechniony w przyrodzie. Występuje w komórkach ludzkich, zwierzęcych, roślinnych (w cytosolu i mitochondriach) i w organizmach prokariotycznych [20,26,66,75]. U ssaków występują trzy izoformy enzymu jabłczanowego: NADP-zależny cytosolowy enzym jabłczanowy (c-NADP-ME) (EC 1.1.1.40), NADP-zależny mitochondrialny enzym jabłczanowy (m-NADP-ME) (EC 1.1.1.40) oraz NAD(P)-zależny mitochondrialny enzym jabłczanowy (m-NAD-ME) (EC 1.1.1.39) [6,9,67]. Wszystkie trzy izoformy enzymu jabłczanowego pochodzące z różnych organizmów mają bardzo podobną budowę przestrzenną [9,74,75]. Aktywny enzym jabłczanowy jest homotetramerem, którego masa cząsteczkowa wynosi około 250 kDa [77]. Monomer cytosolowego ME (64 kDa) izolowanego z ludzkiej wątroby zbudowany jest z 572 aminokwasów [24]. Struktura pierwszorzędowa enzymu jabłczanowego izolowanego z wielu organizmów jest wysoce konserwatywna, co wskazuje, że białko to pełni ważną, ustabilizowaną ewolucyjnie funkcję w przemianach metabolicznych [75].

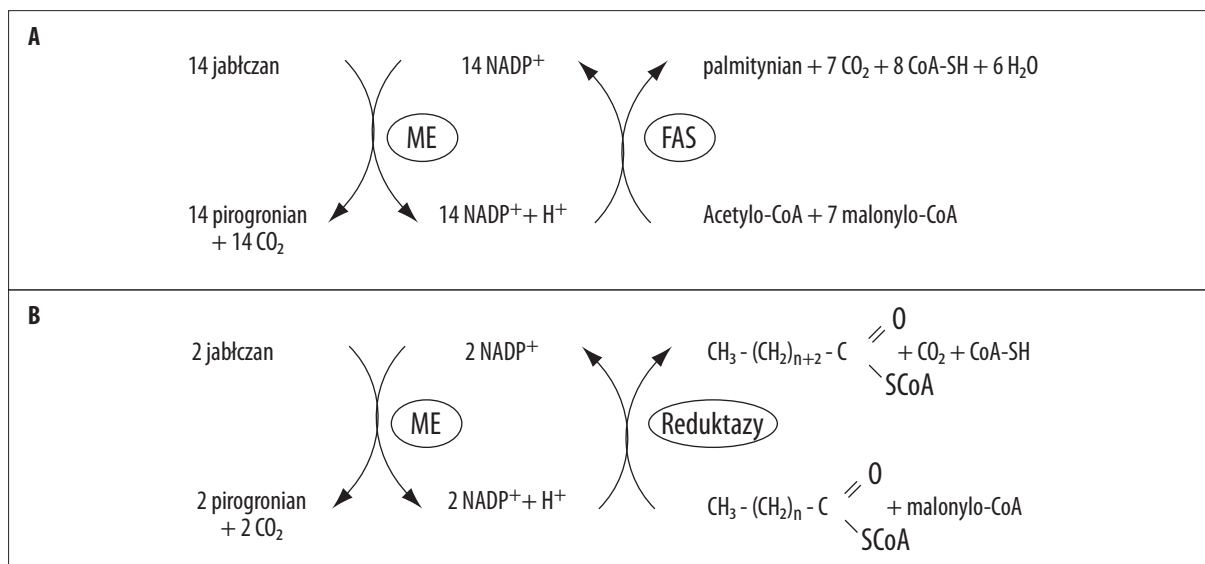
## ROLA CYTOSOLOWEGO ENZYMU JABŁCZANOWEGO W LIPOGENEZIE

Enzym jabłczanowy *in vivo* katalizuje reakcję oksydacyjnej dekarboksylacji jabłczanu do pirogronianu, czemu towarzyszy redukcja NAD(P)<sup>+</sup> do NAD(P)H i uwolnienie dwutlenku węgla [8]. Reakcja ta wymaga obecności dwuwartościowych jonów metalu (najczęściej Mn<sup>2+</sup> lub Mg<sup>2+</sup>), które odgrywają rolę zarówno w procesie katalizy, jak i w stabilizacji struktury przestrzennej enzymu [10]. Powstały NADPH jest wykorzystywany w procesie syntezy kwasu palmitynowego, w reakcji katalizowanej przez syntazę kwasów tłuszczowych (wątroba i tkanka tłuszczowa) (ryc. 1A) oraz w procesie elongacji kwasu tłuszczowego (głównie wątroba) (ryc. 1B).

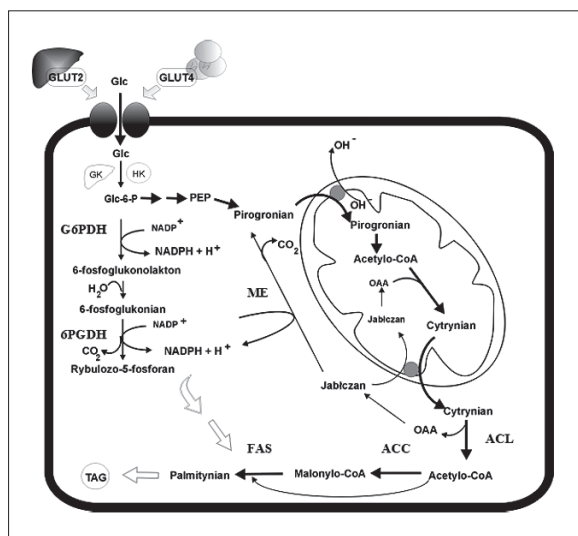
Cytosolowy enzym jabłczanowy, obok takich enzymów jak: syntaza kwasów tłuszczowych, karboksylaza acetylo-CoA, liaza ATP-cytrynianowa, dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa i dehydrogenaza 6-fosfoglukonianowa, jest zaliczany do enzymów lipogennych [20]. Funkcję tych enzymów w procesie lipogenezy przedstawiono na rycinie 2.

## BUDOWA GENU CYTOSOLOWEGO ENZYMU JABŁCZANOWEGO

Znana jest budowa szczurzego genu kodującego cytoplazmatyczny enzym jabłczanowy [43]. Ten wyjątkowo duży gen



Ryc. 1. Rola cytosolowego enzymu jabłczanowego w procesie syntezy kwasu palmitynowego (A) oraz jego elongacji w mikrosomach (B)



Ryc. 2. Rola cytosolowego enzymu jabłczanowego (ME) i innych enzymów lipogennych (FAS, ACC, ACL, G6PDH, 6PGDH) w procesie syntezy kwasu palmitynowego z glukozy (schemat); uwzględniono różnice i podobieństwa między tkanką tłuszczową i wątrobą; Glc – glukoza, GK – glukokinaza, GLUT 2 – transporter glukozy 2, GLUT 4 – transporter glukozy 4, HK – heksokinaza, OAA – szczawiooocjan, PEP – fosfoenolpirogronian

u szczura jest zbudowany z 95 tysięcy par zasad. W genie tym można wyróżnić 14 eksonów przedzielonych 13 wyjątkowo długimi intronami (dłuższymi niż 15 tysięcy par zasad) [43]. Przypuszcza się, że w obrębie tych intronów mogą się znajdować inne geny [27]. Wszystkie eksony, z wyjątkiem ostatniego znajdującego się na końcu 3', mają rozmiary nieodlegające wielkością od eksonów innych genów eukariotycznych i są zbudowane z 76–174 par zasad [5]. Natomiast ostatni ekson znajdujący się na końcu 3' stanowi wyjątkowo długi fragment DNA szczura. Na matrycy genu c-NADP-ME w procesie transkrypcji powstają dwa rodzaje mRNA o długości 3100 zasad (dłuższa postać mRNA) i 2100 zasad (krótsza postać mRNA). Częsteczki te różnią się długością nieulegają-

cego translacji końca 3' [15]. Ostatni ekson (w zależności od wielkości transkryptu) jest zbudowany z 513 lub 1513 nukleotydów. Badając strukturę pierwszorzędową krótszej postaci mRNA ME stwierdzono obecność sekwencji AATAAA. Sekwencja ta stanowi sygnał poliadenylacji typowy dla większości cząsteczek mRNA występujących w komórkach eukariotycznych [42]. Natomiast mRNA ME o długości 3100 zasad zawiera drugi sygnał poliadenylacji ATATAA charakterystyczny dla około 10% eukariotycznych cząsteczek mRNA [43]. Na matrycy obu mRNA ME w procesie translacji powstaje funkcjonalne białko. Stosunek krótkiej postaci mRNA do dłuższej w poszczególnych tkankach jest różny [47]. W wątrobie szczura zwiększonej ekspresji ulega postać krótsza mRNA ME, natomiast w większości tkanek ssaków jest odwrotnie [14]. Te różnice są najprawdopodobniej spowodowane obecnością różnych czynników uczestniczących w procesie poliadenylacji w danych tkankach.

Promotor genu c-NADP-ME ma budowę charakterystyczną dla genów konstytutywnych (housekeeping genes). W promotorze tym (zarówno u szczura, jak i człowieka) nie stwierdzono sekwencji TATA i CCAAT [23,43]. Sekwencja TATA, która w wielu genach znajduje się około 20–30 par zasad powyżej miejsca startu transkrypcji, w przypadku genu c-NADP-ME znajduje się dopiero przy 622 nukleotydzie [44]. Promotor genu c-NADP-ME jest szczególnie bogaty w pary GC, stanowiące ponad 80% wszystkich nukleotydów tego fragmentu DNA. Cechą charakterystyczną jest obecność dziewięciu powtarzających się sześcienuklotydowych sekwencji (CCGCC). Sześć z nich jest zlokalizowanych między pozycją -376 a -10. Jeden z rejonów GC znajduje się w odcinku nieulegającym translacji, natomiast dwa pozostałe znajdują się w obrębie pierwszego intronu. Cztery motywy GC są rozdzielone odcinkami składającymi się z 61, 63 i 65 par nukleotydów. Takie ułożenie motywów GC może mieć znaczenie w procesie rozluźniania (przebudowy) chromatyny, co jest istotne w regulacji ekspresji genów [44]. Brak charakterystycznych dla promotorów genów eukariotycznych sekwencji w genie ME sugeruje, że inicjacja transkrypcji genu c-NADP-ME może się odbywać w kilku miejscach startu transkrypcji [43].

## REGULACJA EKSPRESJI GENU CYTOSOLOWEGO ENZYMU JABŁCZANOWEGO

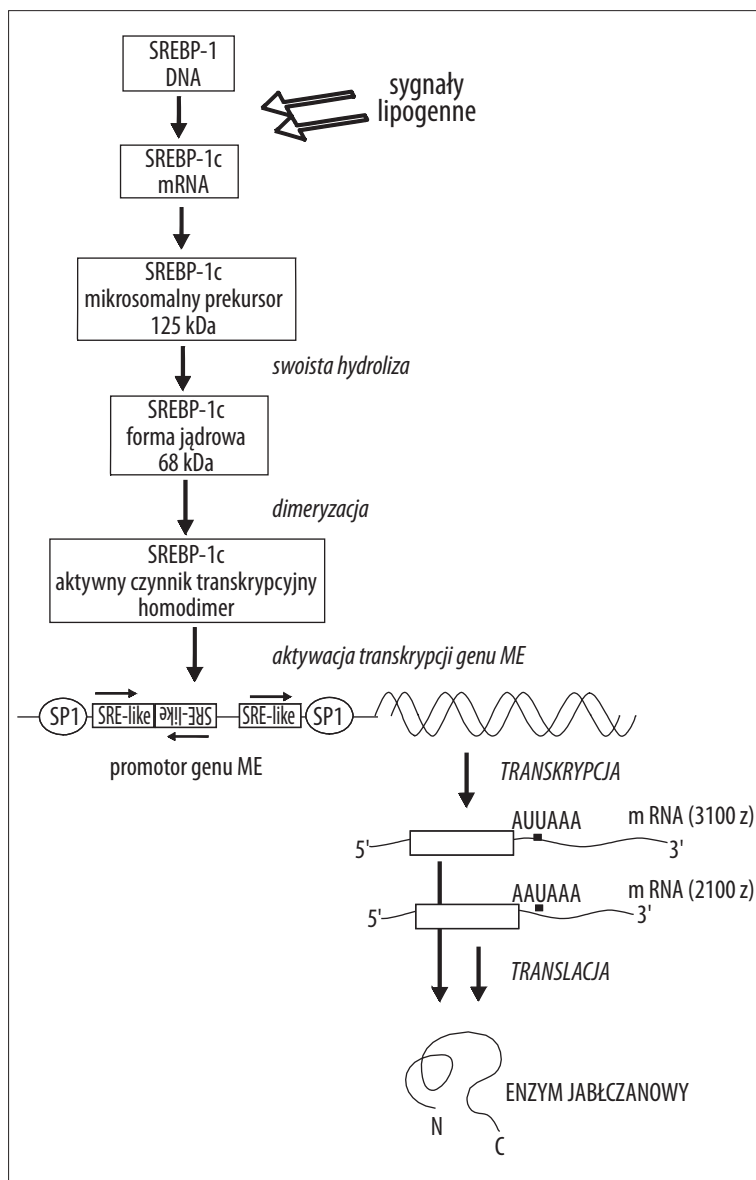
Regulacja ekspresji genu kodującego cytosolowy enzym jabłczanowy zachodzi na etapie transkrypcji i stabilizacji mRNA [40]. Głównie w tkance tłuszczowej i wątrobie aktywność cytosolowej postaci enzymu jabłczanowego zmienia się pod wpływem wielu czynników, takich jak insulina, glukagon, hormony tarczycy, kwasy tłuszczowe czy też kwas retinowy [25]. Jest to związane z obecnością wielu elementów regulatorowych obecnych w rejonie 5' genu c-NADP-ME. W rejonie regulatorowym tego genu są umiejscowione dwa elementy odpowiedzi na insulinę [21]. Pierwszy (IRE-I), o sekwencji nukleotydowej TATTGTTTTG, zajmuje miejsca od -683 do -692. Strukturalnie IRE-I jest podobny do elementu odpowiedzi na insulinę (IRE-A) obecnego w promotorze genu karboksylazy fosfoenolopirogronianowej [48]. Drugi rejon (IRE-II) znajduje się pomiędzy -161 a -170 nukleotydem. Jego sekwencja nukleotydowa bogata w pary GC (CCCGCCTC) przypomina sekwencję odpowiedzi na insulinę obecną w promotorze genu dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego [46]. Rdzeń tej sekwencji (CGCCTC) stanowi ściśle konserwatywny rejon obecny w wielu genach regulowanych przez insulinę [21]. Na podstawie badań przeprowadzonych na szczurach stwierdzono, że IRE-I stanowi negatywny rejon regulatorowy, natomiast IRE-II jest odpowiedzialny za maksymalną aktywację transkrypcji genu enzymu jabłczanowego w odpowiedzi na insulinę. Podanie insuliny szczurom z doświadczenie wywołaną cukrzycą powoduje około 10-krotny wzrost transkrypcji genu c-NADP-ME w wątrobie. Mimo że krótsza postać mRNA jest dominująca, insulina w jednakowym stopniu wpływa na zwiększenie poziomu obu cząsteczek mRNA (krótszej i dłuższej). Z IRE-II mogą wiązać się czynniki transkrypcyjne Sp1 i Sp3 [53] oraz czynnik Egr-1. Miejsca wiązania tych czynników w promotorze zachodzą na siebie. Zaobserwowano, że po zadziałaniu insuliny na komórki wątrobiaka H-35 dochodzi początkowo do zahamowania ekspresji genu enzymu jabłczanowego. Przyczyną jest związanie się z IRE-II czynnika Egr-1, który wypiera związane z tym rejonem czynniki Sp prowadząc do zahamowania aktywności promotora tego genu. W późniejszej fazie insulina uruchamia sygnały prowadzące do aktywacji korepresora czynnika Egr-1, co powoduje uwolnienie tego białka z sekwencji IRE-II. Umożliwia to związanie Sp1 i Sp3 z tą sekwencją, a w konsekwencji aktywację transkrypcji genu. Czynniki te są w sposób konstytutywny związane z rejonem IRE-II. Uważa się, że biorą one udział w podstawowej, oraz indukowanej przez insulinę ekspresji genu c-NADP-ME. Stwierdzono, że czynnik Sp1 odgrywa główną rolę w podstawowej transkrypcji genów, niezawierających w promotorze sekwencji TATA oraz jest białkiem, które oddziałuje z wieloma różnymi czynnikami transkrypcyjnymi [33]. Aktywność czynnika Sp1 może być regulowana poprzez fosforylację/defosforylację [3,53]. Proces ten zachodzi w przypadku genu karboksylazy acetylo-CoA [12]. Aktywacja transkrypcji tego genu w odpowiedzi na glukozę związana jest z defosforylacją czynnika Sp1. Podobny mechanizm może także zachodzić w przypadku genu enzymu jabłczanowego.

Ponadto, w badaniach na komórkach wykazano także, że w regulacji genu enzymu jabłczanowego przez insulinę odgrywa rolę czynnik AP-1 [65]. W promotorze tego

genu znajduje się sekwencja wiążąca AP-1 (sekwencja TGACTCA). Gen enzymu jabłczanowego jest drugim znanym genem (pierwszy stanowi gen kolagenazy), którego transkrypcję insulina stymuluje, przynajmniej częściowo, poprzez rejon AP-1 [65]. Na podstawie badań przeprowadzonych na myszach stwierdzono, że wzrost stężenia glukozy i insuliny we krwi prowadzi do akumulacji aktywnego receptora insuliny w jądrach komórek wątroby. Konsekwencją tego jest defosforylacja wiążącego się z DNA 30 kDa białka i wzrost ekspresji genu enzymu jabłczanowego [22]. Badania ostatnich lat wskazują, że głównym czynnikiem transkrypcyjnym, z udziałem którego insulina aktywuje ekspresję genów enzymów lipogennych jest SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein-1c) [18]. SREBP-1c występuje w komórkach wielu różnych tkanek i narządów, ale szczególnie wysoki poziom ekspresji ma w wątrobie, tkance tłuszczowej, nadnerczach i mózgu [55,57]. Działanie czynnika SREBP-1c (w przeciwieństwie do dwóch innych głównych izoform SREBP: SREBP-2 i SREBP-1a) jest ograniczone do regulacji ekspresji genów kodujących białka związane z biosyntezą kwasów tłuszczowych i triacylogliceroli [16,37]. Czynniki SREBP są syntetyzowane w postaci nieaktywnego prekursora związanego z błoną siateczki śródplazmatycznej (ER) [58]. W ER prekursorowa postać SREBP tworzy kompleks z obecnym w błonie białkiem SCAP (SREBP cleavage activating protein). Białko to uczestniczy w transporcie postaci prekursorowej do aparatu Golgiego, gdzie dochodzi do hydrolizy nieaktywnej postaci SREBP z udziałem kolejno proteaz: S1P i S2P [29]. Uwolniona N-terminalna domena białka SREBP tworzy dimery i w tej postaci stanowi aktywny czynnik transkrypcyjny o strukturze bHLH-LZ (helisa-pętla-helisa-suwak leucynowy) [68], który jest transportowany do jądra komórkowego (najprawdopodobniej w formie dimeru) z udziałem białka importyn  $\beta$  [45]. W jądrze komórkowym aktywna (jądrowa) postać tego białka wiąże się do klasycznej sekwencji odpowiedzi na sterole (SRE) lub sekwencji do niej podobnych (SRE-like) obecnych w rejonach regulatorowych wielu genów związanych z metabolizmem lipidów [2,70].

W promotorze genu c-NADP-ME znaleziono sekwencję rozpoznawaną przez białka SREBP [1,54]. Wykazano, że SREBP-1c jest szczególnie związany z aktywacją ME w tkance tłuszczowej [4,61,62]. Na rycinie 3 przedstawiono udział czynnika SREBP w regulacji ekspresji genu ME. W lipogennych narządach ssaków, czynniki dietetyczne i hormony w podobny sposób wpływają na ekspresję obu genów: c-NADP-ME i SREBP-1. Z doświadczeń przeprowadzonych na zwierzętach wynika, że głodzenie obniża poziom zarówno mRNA SREBP-1c, jak i mRNA ME, natomiast następujące po nim karmienie dietą bogatą w węglowodany prowadzi do wzrostu poziomu mRNA obu białek zarówno w wątrobie, jak i w tkance tłuszczowej [28,34].

Zastosowanie diety redukcyjnej (dobowe ograniczenie ilości spożywanego przez szczury pokarmu) zakończonej karmieniem do syta również prowadzi do wzrostu ilości mRNA i poziomu białka SREBP-1 oraz ekspresji genu ME (mierzonej ilością mRNA i białka oraz aktywnością ME) w tkance tłuszczowej badanych zwierząt [62]. Nadekspresja SREBP-1c w wątrobie zapobiega zahamowaniu indukcji genów enzymów lipogennych podczas głodu [28]. Natomiast w prawidłowych warunkach, nadekspresja



Rys. 3. Udział czynnika transkrypcyjnego SREBP-1c w aktywacji transkrypcji genu kodującego cytosolowy enzym jabłczanowy. Szczegóły dotyczące aktywacji SREBP-1c zamieszczono w tekście. Budowę promotora przedstawiono w oparciu o informacje zamieszczone w [45]

SREBP-1c u myszy prowadzi do wzrostu szybkości procesu lipogenezy i wzrostu poziomu mRNA enzymów lipogennych [55,58]. Ponadto u zwierząt z nieczynnym genem SREBP-1 proces lipogenezy w wątrobie, mimo stymulacji dietą, był zahamowany, chociaż gen SREBP-2 ulegał ekspresji na prawidłowym poziomie [56]. Badania na myszach z nieczynnym częściowo genem SREBP-1 (brak formy mRNA SREBP-1c) wykazały również, że SREBP-1a i SREBP-2 mogą częściowo zastąpić SREBP-1c w wywołanej przez insulinę aktywacji ekspresji genów FAS i ACC. W przypadku pozostałych genów enzymów lipogennych (w tym również genu enzymu jabłczanowego) tego procesu nie zaobserwowano [38]. Jednakże zarówno badania *in vitro*, jak i *in vivo* wskazują, że SREBP-1c nie jest jedynym czynnikiem niezbędnym do pełnej indukcji genów enzymów lipogennych w odpowiedzi na dietę bogatą w węglowodany [35,64]. Uważa się, że oprócz szlaku indukowanego przez insulinę transport i metabolizm glukozy jest kontrolowany przez inny szlak sygnałowy, w którym głównym metabolitem jest glukozo-6-fosforan lub ksylulo-

zo-5-fosforan. Wewnątrzkomórkowy mechanizm działania szlaku indukowanego przez glukozę nadal pozostaje niewyjaśniony. Wykazano, że glukozę aktywuje transkrypcję genów działając poprzez czynnik transkrypcyjny, określony jako białko wiążące sekwencję odpowiedzi na węglowodany (ChREBP) (lub ChoRF – czynnik odpowiedzi na węglowodany). W rejonie promotorowym niektórych genów enzymów lipogennych (FAS, ACC) znaleziono sekwencję odpowiedzi na węglowodany (ChoRE) [49,52], rozpoznawaną przez ChREBP [32]. Zbudowana jest ona z dwóch sekwencji, określanych jako E-box (CACGTG) (lub sekwencji bardzo do niej podobnych) przedzielonych fragmentem zbudowanym z 5 par zasad. W przeciwieństwie do SREBP-1c funkcjonującego jako homodimer, ChREBP wiąże się z sekwencją odpowiedzi na węglowodany tylko w obecności innego czynnika transkrypcyjnego – Mix [63]. Dotąd w rejonie promotorowym genu ME nie zidentyfikowano sekwencji ChoRE, jednak najnowsze badania wskazują, że heterodimer ChREBP/Mix uczestniczy w regulacji ekspresji genu ME w hepatocytach szczura [39]. Regulacja

ChREBP odbywa się za pośrednictwem fosforylacji/defosforylacji zwłaszcza w odpowiedzi na cAMP i glukozę [69]. Obecnie uważa się, że w odpowiedzi na głodzenie/karmienie, SREBP-1c i ChoRF wspólnie odgrywają rolę w indukcji genów enzymów lipogennych i glikolitycznych w wątrobie [19,64]. Warto również zaznaczyć, że podobnie jak SREBP1-c, duże stężenie ChREBP występuje w wątrobie i tkance tłuszczowej – narządach, gdzie proces lipogenezy jest najbardziej aktywny [30,39,73].

Zarówno insulina, jak i SREBP-1 stymulują ekspresję innego ważnego czynnika transkrypcyjnego – PPAR $\gamma$  (receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów  $\gamma$ ) [17,71]. PPAR $\gamma$  występuje w tkance tłuszczowej i bierze udział w procesie różnicowania preadipocytów w adipocyty oraz w regulacji ekspresji genów enzymów lipogennych [59] w tym genu kodującego enzym jabłczanowy [7,31]. Również gromadzenie się TAG w wątrobie jest związane z gwałtownym wzrostem ekspresji PPAR $\gamma$  w tym narządzie [11,31]. To wskazuje na możliwą rolę tego czynnika w stymulowaniu procesu lipogenezy.

Dobrze udokumentowany jest także wpływ hormonów tarczycy na ekspresję genu kodującego cytosolową postać ME w wątrobie [41] i tkance tłuszczowej szczura [76] i wątrobie kurczaka [14,25]. Na podstawie badań *in vivo* stwierdzono, że pod wpływem T3 poziom transkrypcji genu ME w wątrobie szczura wzrasta około 4-krotnie. Trijodotyronina stabilizuje mRNA ME, powodując prawie 14-krotny wzrost poziomu mRNA ME [14,15,60]. U szczura w promotorze genu ME znajdują się przynajmniej trzy elementy odpowiedzi na hormony tarczycy (TRE) umiejscowione w odległości –300, –150 i –50 par zasad [50,51]. W obecności T3, z sekwencjami tymi wiąże się swoiste zarówno  $\alpha$ - jak i  $\beta$ -receptory jądrowe T3, które w połączeniu z innymi białkami prowadzą do aktywacji transkrypcji genu ME [13,50]. Badania przeprowadzone na hepatocytach izolowanych z embrionów kurczaka doprowadziły do identyfikacji białek odpowiedzialnych za wiązanie receptora  $\alpha$ . Wiązanie takich czynników jak PBX1a i PBX1b oraz heterodimeru PBX-MEIS1 z receptorem  $\alpha$  w obecności T3 prowadzi do silnego (około 40-krotnego) wzrostu transkrypcji genu ME w tych komórkach [72].

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Amemiya-Kudo M., Shimano H., Hasty A.H., Yahagi N., Yoshikawa T., Matsuzaka T., Okazaki H., Tamura Y., Iizuka Y., Ohashi K., Osuga J., Harada K., Gotoda T., Sato R., Kimura S., Ishibashi S., Yamada N.: Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J. Lipid Res.*, 2002; 43: 1220–1235
- [2] Athanikar J.N., Osborne T.F.: Specificity in cholesterol regulation of gene expression by coevolution of sterol regulatory DNA element and its binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 4935–4940
- [3] Barroso I., Santisteban P.: Insulin-induced early growth response gene (Egr-1) mediates a short term repression of rat malic enzyme gene transcription. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 17997–18004
- [4] Bertile F., Raclot T.: mRNA levels of SREBP-1c do not coincide with the changes in adipose lipogenic gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 325: 827–834
- [5] Blake C.: Exons – present from the beginning? *Nature*, 1983; 306: 535–537
- [6] Bukato G., Kochan Z., Świerczyński J.: Purification and properties of cytosolic and mitochondrial malic enzyme isolated from human brain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1995; 27: 47–54
- [7] Castelein H., Gulick T., Declercq P.E., Mannaerts G.P., Moore D.D., Baes M.I.: The peroxisome proliferator activated receptor regulates malic enzyme gene expression. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 26754–26758
- [8] Chang G.G., Huang T.M., Wang J.K., Lee H.J., Chou W.Y., Meng C.L.: Kinetic mechanism of the cytosolic malic enzyme from human breast cancer cell line. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992; 296: 468–473
- [9] Chang G.G., Tong L.: Structure and function of malic enzymes, a new class of oxidative decarboxylases. *Biochemistry*, 2003; 42: 12721–12733
- [10] Chang H.C., Chou W.Y., Chang G.G.: Effect of metal binding on the structural stability of pigeon liver malic enzyme. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 4663–4671
- [11] Chao L., Marcus-Samuels B., Mason M.M., Moitra J., Vinson C., Arioglio E., Gavrilova O., Reitman M.L.: Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J. Clin. Invest.*, 2000; 106: 1221–1228
- [12] Daniel S., Kim K.H.: Sp1 mediates glucose activation of the acetyl-CoA carboxylase promoter. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 1385–1392

## PODSUMOWANIE

W wątrobie i tkance tłuszczowej cytosolowy enzym jabłczanowy dostarcza równoważników redukcyjnych niezbędnych w procesie lipogenezy, częściowo odpowiedzialnej za gromadzenie się triacylogliceroli głównie w tkance tłuszczowej. Zmiana aktywności enzymu jabłczanowego, odzwierciedlająca jednocześnie aktywność lipogenną (zdolność do syntezy kwasów tłuszczowych) tkanki tłuszczowej i wątroby, jest uwarunkowana zmianami ekspresji genu kodującego ten enzym. Regulacja ekspresji genu c-NADP-ME (ściśle skorelowana z regulacją procesu lipogenezy) jest procesem skomplikowanym, nie do końca jeszcze wyjaśnionym, w który mogą być zaangażowane różne czynniki transkrypcyjne. Poznanie i wyjaśnianie mechanizmów regulujących ten proces, może mieć nie tylko znaczenie poznawcze, ale również praktyczne. Wzrost lipogenezy (związany ze wzrostem ekspresji genów enzymów lipogennych), spowodowany nadmiarem spożywanego pokarmu, prowadzi do gromadzenia się triacylogliceroli w tkance tłuszczowej. To z kolei może prowadzić do otyłości – jednego z poważniejszych problemów współczesnej cywilizacji. Powszechnie wiadomo, że otyłość stwarza nie tylko ryzyko rozwoju wielu poważnych schorzeń, takich jak miażdżyca, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca typu 2, schorzenia wątroby i nerek, ale także utrudnia ich leczenie. W związku z tym opracowano różne metody leczenia tego stanu: farmakologiczne, chirurgiczne i polegające na zmianie sposobu odżywiania. Ponieważ ilość i rodzaj spożywanego pokarmu mają wpływ na ekspresję genu enzymu jabłczanowego, poznanie regulacji tego procesu pod wpływem różnych czynników dietetycznych i hormonalnych, może być cenną wskazówką do opracowania racjonalnej, opartej na podstawach molekularnych, kuracji otyłości.

## PODZIĘKOWANIA

Dziękuję Panu Prof. dr hab. Julianowi Świerczyńskiemu z Katedry i Zakładu Biochemii Akademii Medycznej w Gdańsku za cenne uwagi, wskazówki i pomoc w przygotowaniu tej pracy.

- [13] Desvergne B., Petty K.J., Nikodem V.M.: Functional characterization and receptor binding studies of the malic enzyme thyroid hormone response element. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266: 1008–1013
- [14] Dozin B., Magnuson M.A., Nikodem V.M.: Tissue-specific regulation of two functional malic enzyme mRNAs by triiodothyronine. *Biochemistry*, 1985; 24: 5581–5586
- [15] Dozin B., Magnuson M.A., Nikodem V.M.: Thyroid hormone regulation of malic enzyme synthesis. Dual tissue-specific control. *J. Biol. Chem.*, 1986; 261: 10290–10292
- [16] Edwards P.A., Tabor D., Kast H.R., Venkateswaran A.: Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000; 1529: 103–113
- [17] Fajas L., Schoonjans K., Gelman L., Kim J.B., Najib J., Martin G., Fruchart J.C., Briggs M., Spiegelman B.M., Auwerx J.: Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol. Cell. Biol.*, 1999; 19: 5495–5503
- [18] Foretz M., Guichard C., Ferré P., Foufelle F.: Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 12737–12742
- [19] Foufelle F., Ferré P.: New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem. J.*, 2002; 366: 377–391
- [20] Frenkel R.: Regulation and physiological functions of malic enzymes. *Curr. Top. Cell. Regul.*, 1975; 9:157–181
- [21] Garcia-Jimenez C., Benito B., Jolin T., Santisteban P.: Insulin regulation of malic enzyme gene expression in rat liver: evidence for nuclear proteins that bind to two putative insulin response elements. *Mol. Endocrinol.*, 1994; 8: 1361–1369
- [22] Gletsu N., Dixon W., Clandinin M.T.: Insulin receptor at the mouse hepatocyte nucleus after a glucose meal induces dephosphorylation of a 30-kDa transcription factor and a concomitant increase in malic enzyme gene expression. *J. Nutr.*, 1999; 129: 2154–2161
- [23] González-Manchón C., Butta N., Ferrer M., Ayuso M.S., Parrilla R.: Molecular cloning and functional characterization of the human cytosolic malic enzyme promoter: thyroid hormone responsiveness. *DNA Cell Biol.*, 1997; 16: 533–544
- [24] González-Manchón C., Ferrer M., Ayuso M.S., Parrilla R.: Cloning, sequencing and functional expression of a cDNA encoding a NADP-dependent malic enzyme from human liver. *Gene*, 1995; 159: 255–260
- [25] Goodridge A.G., Klautky S.A., Fantozzi D.A., Baillie R.A., Hodnett D.W., Chen W., Thurmond D.C., Xu G., Roncero C.: Nutritional and hormonal regulation of expression of the gene for malic enzyme. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 1996; 52: 89–122
- [26] Groenewald M., Viljoen-Bloom M.: Factors involved in the regulation of the *Schizosaccharomyces pombe* malic enzyme gene. *Curr. Genet.*, 2001; 39: 222–230
- [27] Henikoff S., Keene M.A., Fecht K., Fristrom J.W.: Gene within a gene: nested *Drosophila* genes encode unrelated proteins on opposite DNA strands. *Cell*, 1986; 44: 33–42
- [28] Horton J.D., Bashmakov Y., Shimomura I., Shimano H.: Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 5987–5992
- [29] Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S.: SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.*, 2002; 109: 1125–1131
- [30] Iizuka K., Bruick R.K., Liang G., Horton J.D., Uyeda K.: Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 7281–7286
- [31] Ijpenberg A., Jeannin E., Wahl W., Desvergne B.: Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 20108–20117
- [32] Ishii S., Iizuka K., Miller B.C., Uyeda K.: Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 15597–15602
- [33] Karlseder J., Rotheneder H., Wintersberger E.: Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F. *Mol. Cell Biol.*, 1996; 16: 1659–1667
- [34] Kim J.B., Sarraf P., Wright M., Yao K.M., Mueller E., Solanes G., Lowell B.B., Spiegelman B.M.: Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J. Clin. Invest.*, 1998; 101: 1–9
- [35] Koo S.H., Dutcher A.K., Towle H.C.: Glucose and insulin function through two distinct transcription factors to stimulate expression of lipogenic enzyme genes in liver. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 9437–9445
- [36] Kornberg A.: Remembering our teachers. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 3–11
- [37] Li J.N., Mahmoud M.A., Han W.F., Ripple M., Pizer E.S.: Sterol regulatory element-binding protein-1 participates in the regulation of fatty acid synthase expression in colorectal neoplasia. *Exp. Cell Res.*, 2000; 261: 159–165
- [38] Liang G., Yang J., Horton J.D., Hammer R.E., Goldstein J.L., Brown M.S.: Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 9520–9528
- [39] Ma L., Tsatsos N.G., Towle H.C.: Direct role of ChREBP/Mlx in regulating hepatic glucose-responsive genes. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 12019–12027
- [40] Ma X.J., Salati L.M., Ash S.E., Mitchell D.A., Klautky S.A., Fantozzi D.A., Goodridge A.G.: Nutritional regulation and tissue-specific expression of the malic enzyme gene in the chicken. Transcriptional control and chromatin structure. *J. Biol. Chem.*, 1990; 265: 18435–18441
- [41] Magnuson M.A., Dozin B., Nikodem V.M. Regulation of specific rat liver messenger ribonucleic acids by triiodothyronine. *J. Biol. Chem.*, 1985; 260: 5906–5912
- [42] Magnuson M.A., Morioka H., Tecce M.F., Nikodem V.M.: Coding nucleotide sequence of rat liver malic enzyme mRNA. *J. Biol. Chem.*, 1986; 261: 1183–1186
- [43] Morioka H., Magnuson M.A., Mitsuhashi T., Song M.K., Rall J.E., Nikodem V.M.: Structural characterization of the rat malic enzyme gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989; 86: 4912–4916
- [44] Morioka H., Tennyson G.E., Nikodem V.M.: Structural and functional analysis of the rat malic enzyme gene promoter. *Mol. Cell. Biol.*, 1988; 8: 3542–3545
- [45] Nagoshi E., Imamoto N., Sato R., Yoneda Y.: Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip)-containing transcription factor, occurs through the direct interaction of importin beta with HLH-Zip. *Mol. Biol. Cell*, 1999; 10: 2221–2233
- [46] Nasrin N., Ercolani L., Denaro M., Kong X.F., Kang I., Alexander M.: An insulin response element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene binds a nuclear protein induced by insulin in cultured cells and by nutritional manipulations *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990; 87: 5273–5277
- [47] Nikodem V.M., Magnuson M.A., Dozin B., Morioka H.: Coding nucleotide sequence of rat malic enzyme mRNA and tissue specific regulation by thyroid hormone. *Endocr. Res.*, 1989; 15: 547–564
- [48] O'Brien R.M., Lucas P.C., Forest C.D., Magnuson M.A., Granner D.K.: Identification of a sequence in the PEPCK gene that mediates a negative effect of insulin on transcription. *Science*, 1990; 249: 533–537
- [49] O'Callaghan B.L., Koo S.H., Wu Y., Freaque H.C., Towle H.C.: Glucose regulation of the acetyl-CoA carboxylase promoter PI in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 16033–16039
- [50] Petty K.J., Desvergne B., Mitsuhashi T., Nikodem V.M.: Identification of a thyroid hormone response element in the malic enzyme gene. *J. Biol. Chem.*, 1990; 265: 7395–7400
- [51] Petty K.J., Morioka H., Mitsuhashi T., Nikodem V.M.: Thyroid hormone regulation of transcription factors involved in malic enzyme gene expression. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264: 11483–11490
- [52] Rufo C., Teran-Garcia M., Nakamura M.T., Koo S.H., Towle H.C., Clarke S.D.: Involvement of a unique carbohydrate-responsive factor in the glucose regulation of rat liver fatty-acid synthase gene transcription. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 21969–21975
- [53] Samson S.L., Wong N.C.: Role of Sp1 in insulin regulation of gene expression. *J. Mol. Endocrinol.*, 2002; 29: 265–279
- [54] Shimano H.: Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog. Lipid Res.*, 2001; 40: 439–452
- [55] Shimano H., Horton J.D., Shimomura I., Hammer R.E., Brown M.S., Goldstein J.L.: Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J. Clin. Invest.*, 1997; 99: 846–854

- [56] Shimano H., Yahagi N., Amemiya-Kudo M., Hasty A.H., Osuga J., Tamura Y., Shionoiri F., Iizuka Y., Ohashi K., Harada K., Gotoda T., Ishibashi S., Yamada N.: Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 35832–35839
- [57] Shimomura I., Shimano H., Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S.: Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J. Clin. Invest.*, 1997; 99: 838–845
- [58] Shimomura I., Shimano H., Korn B.S., Bashmakov Y., Horton J.D.: Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 35299–35306
- [59] Smith S.A.: Peroxisome proliferator-activated receptors and the regulation of mammalian lipid metabolism. *Biochem. Soc. Trans.*, 2002; 30: 1086–1090
- [60] Song M.K., Dozin B., Grieco D., Rall J.E., Nikodem V.M.: Transcriptional activation and stabilization of malic enzyme mRNA precursor by thyroid hormone. *J. Biol. Chem.*, 1988; 263: 17970–17974
- [61] Stelmańska E., Korczyńska J., Świerczyński J.: Tissue-specific effect of refeeding after short- and long-term caloric restriction on malic enzyme gene expression in rat tissues. *Acta Biochim. Pol.*, 2004; 51: 805–814
- [62] Stelmańska E., Sucajtys-Szulc E., Korczyńska J., Adrych K., Świerczyński J.: Diversity of SREBP-1 gene expression in rat adipose tissue depots in response to refeeding after food restriction. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, 1733: 130–136
- [63] Stoekman A.K., Ma L., Towle H.C.: Mlx is the functional heteromeric partner of the carbohydrate response element-binding protein in glucose regulation of lipogenic enzyme genes. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 15662–15669
- [64] Stoekman A.K., Towle H.C.: The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 27029–27035
- [65] Streeper R.S., Chapman S.C., Ayala J.E., Svitek C.A., Goldman J.K., Cave A., O'Brien R.M.: A phorbol ester-insensitive AP-1 motif mediates the stimulatory effect of insulin on rat malic enzyme gene transcription. *Mol. Endocrinol.*, 1998; 12: 1778–1791
- [66] Sun S.B., Shen Q.R., Wan J.M., Liu Z.P.: Induced expression of the gene for NADP-malic enzyme in leaves of *Aloe vera* L. under salt stress. *Acta Biochim. Biophys. Sinica*, 2003, 35: 423–429
- [67] Taroni F., Di Donato S.: Purification and properties of cytosolic malic enzyme from human skeletal muscle. *Int. J. Biochem.*, 1988; 20: 857–866
- [68] Tontonoz P., Kim J.B., Graves R.A., Spiegelman B.M.: ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, 1993; 13: 4753–4759
- [69] Uyeda K., Yamashita H., Kawaguchi T.: Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage. *Biochem. Pharmacol.*, 2002; 63: 2075–2080
- [70] Vallett S.M., Sanchez H.B., Rosenfeld J.M., Osborne T.F.: A direct role for sterol regulatory element binding protein in activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 12247–12253
- [71] Vidal-Puig A.J., Considine R.V., Jimenez-Linan M., Werman A., Pories W.J., Caro J.F., Flier J.S.: Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J. Clin. Invest.*, 1997; 99: 2416–2422
- [72] Wang Y., Yin L., Hillgartner F.B.: The homeodomain proteins PBX and MEIS1 are accessory factors that enhance thyroid hormone regulation of the malic enzyme gene in hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 23838–23848
- [73] Yamashita H., Takenoshita M., Sakurai M., Bruick R.K., Henzel W.J., Shillinglaw W., Arnot D., Uyeda K.: A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 9116–9121
- [74] Yang Z., Floyd D.L., Loeber G., Tong L.: Structure of a closed form of human malic enzyme and implications for catalytic mechanism. *Nat. Struct. Biol.*, 2000; 7: 251–257
- [75] Yang Z., Zhang H., Hung H.C., Kuo C.C., Tsai L.C., Yuan H.S., Chou W.Y., Chang G.G., Tong L.: Structural studies of the pigeon cytosolic NADP<sup>+</sup>-dependent malic enzyme. *Protein Sci.*, 2002; 11: 332–341
- [76] Zabrocka L., Klimek J., Świerczyński J.: Pharmacological doses of triiodothyronine upregulate lipogenic enzyme gene expression in rat white adipose tissue. *Horm. Metab. Res.*, 2006; 38: 63–68
- [77] Żelewski M., Świerczyński J.: Malic enzyme in human liver. Intracellular distribution, purification and properties of cytosolic isozyme. *Eur. J. Biochem.*, 1991; 201: 339–345